

ラット中枢神経系発達における甲状腺ホルモン作用 の critical period について

—甲状腺ホルモン作用の critical period —

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口昂教授)

鈴木 祐 吉

(昭和55年9月26日受付)

胎生期から新生児期にかけて, ある種のホルモンには, そのホルモンの過不足がその作用を及ぼす標的器官の発生, 機能の分化に対し, 修復不可能な変化をもたらすことが知られている¹⁾²⁾. このような器官発生及び機能発現にホルモン作用が不可欠な時期を critical period と称する. 甲状腺ホルモン作用の中枢神経発達についての critical period に関しては, 従来, 形態^{3)~5)}, 生理的機能⁶⁾⁷⁾, 酵素活性⁸⁾⁹⁾, 生化学^{10)~13)}の分野から個々に研究がなされてきているが, 多指標による総合的な検討は少ない. 更に, これらの報告は出生時の radiological 又は surgical な thyroidectomy による永続的な甲状腺機能低下症によって引き起された結果を述べたものが多く^{10)~18)}, その変化が成長過程のいかなる時期で非可逆的となるのかを検討したものは少ないようである.

近年, 甲状腺刺激ホルモン (TSH), サイロキシン (T₄), トリヨードサイロニン (T₃) が微量の血液によって測定されるようになり, 先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症) が乳児期早期に診断可能となってきた¹⁹⁾²⁰⁾. 臨床的には, クレチン症に対して, 中枢神経系の急速な発達時期である胎生末期から出生後早期の間に適切な甲状腺ホルモンの補充療法がなされないと, その後の神経発達に重大な影響が生じると考えられている²¹⁾²²⁾. しかしながら, 「生後の補充療法によって, 在胎期の甲状腺機能低下症に起因する欠損症状を回復できるか?」という疑問には十分な基礎的解答が得られていない. この問題を解く手懸りを得るために, 妊娠ラットに propylthiouracil (PTU) を投与し, 胎盤あるいは母乳を介して仔ラットに実験的甲状腺機能低

下状態を作製し, その影響を中枢神経発達を中心として, 総合的に検討し, 甲状腺ホルモン作用の critical period を明らかにすることを試みた.

材料及び方法

ラットにおける甲状腺発生は在胎 17 日から 19 日目に始まるとされ²³⁾, Wistar 系ラットに妊娠第 14 日目より 0.05 % PTU (6-n-propyl-2-thiouracil, Sigma Chemical Co.) 溶液を投与し, 甲状腺機能低下ラットを作製した. 妊娠第 25 日目に出生した仔ラットを PTU 投与期間により 3 群に分けた. I 群は胎生期のみ PTU 投与を受けた群, II 群は胎生期から生後 1 週まで PTU 投与を受けた群, III 群は胎生期から生後 2 週まで PTU 投与を受けた群とした. これらの群の同腹の半数に PTU 投与中止後, L-T₄ (3,3',5,5'-tetraiodo-L-thyronine, Sigma Chemical Co.) 2 μ g を隔日に 3 回皮下注射にて投与し, 各々 I T₄ 群, II T₄ 群, III T₄ 群とした. PTU 溶液の代りに水道水を投与した母ラットから出生した仔ラットをコントロール群とし, 各群のラットを生後 5 週まで飼育し, 以下の項目について比較検討を行なった. なお, 飼料はオリエンタル固型飼料を使用した.

1. 体重増加: 1 週毎に体重測定を行なった.
2. 開眼時期: 両眼の開眼をもって開眼時期とした.
3. 驚愕反射の出現時期: 音刺激に対する反応をみた.
4. 低温環境への適応: 生後 2 週に 20 °C の室温に 30 分間放置, 又生後 4 週に 4 °C の低温室に 30 分間放置し, 電子体温計にて体温を測定した.
5. 生後 3 週及び 5 週に大脳及び小脳の重量, DNA, RNA 含量, ³H-

The Critical Period of Thyroid Hormone Actions to the Development of Central Nervous System in Rats. Yukichi Suzuki, Department of Pediatrics (Director Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

thymidine の DNA への取り込みを検討した。

大脳及び小脳の DNA, RNA 等の生化学的検討は ^3H -thymidine ($6\text{-}^3\text{H}$ -thymidine, $15\text{mCi}/\text{mmol}$, New England Nuclear) $5\mu\text{Ci}$ を屠殺 4 時間前にラット腹腔内に投与し、エーテル麻酔下で脱血死させ、脳を摘出し、脳に含まれる DNA, RNA を Schmidt-Thanheuser 法²⁴⁾により抽出した。すなわち、白質を出来る限り除去した後、20% homogenate を作製し、5% ないし 10% 過塩素酸を加え、酸可溶性分画を除去し、更にエタノール・エーテルにより脂質除去を行なった。その後、0.2 規定 KOH を加え、 37°C 20 時間アルカリ分解を行ない、10% 過塩素酸を加え、遠心後、その上清を RNA 分画とした。更に、残った沈澱に 5% 過塩素酸を加え、 90°C 、15 分間加水分解後、遠心し上清を DNA 分画とした。DNA, RNA の測定は紫外吸収 (O. D. 260nm, Hitachi Spectrometer) にて行なった。DNA-P の紫外吸収係数は calf thymus DNA (P-L Biochemical Inc.) のリン濃度を Fiske-Subbarow 法²⁵⁾により測定し、 $\epsilon(p) = 5.8$ を得た。RNA-P の紫外吸収係数は $\epsilon(p) = 10.5$ とした¹⁰⁾。 ^3H -thymidine の DNA への取り込みは DNA 分画 1 ml

を Aquasol (New England Nuclear) 9 ml に溶解させ、DNA 分画に含まれる ^3H の放射活性を Aloka LSC-671 scintillation counter にて測定した。

成 績

体重増加 (図 1) : 出生時体重はコントロール群で $5.9 \pm 0.2\text{g}$, PTU 処置群で $5.1 \pm 0.4\text{g}$ であり, PTU 処置群に低出生体重を認めた。生後 3 週での体重はコントロール群に対し, I T4 群, II 群, III 群, III T4 群に有意な低体重が認められ, 生後 5 週では T4 補充にも関わらず, PTU 処置群全てに体重増加不良を認めた。PTU 処置群と T4 補充群との比較では, 生後 5 週において T4 補充群の体重が重い傾向を示した。体重増加曲線は 1 週毎の体重増加をもって表わしたが, 実線で示したコントロール群のピークが生後 4~5 週の間に認められるのに対し, PTU 処置群では, 生後 5~6 週にピークを認め体重の急速な増加時期が遅延していた。

開眼時期 (図 2) : 100% 開眼率は実線で示したコントロール群では生後 15 日目であるが, I 群, II 群では 16 日目, III 群では 17 日目であった。T4 補充による改善は I T4 群, II T4 群に認められたが, III T4 群では

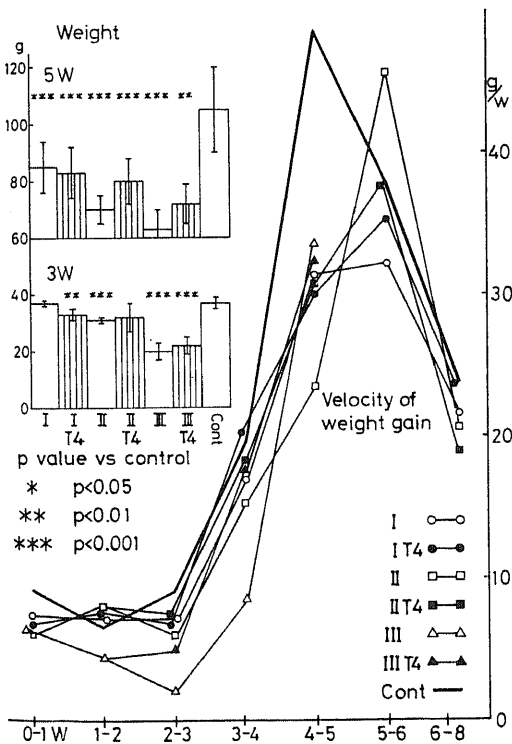


図 1 生後 3 週と 5 週におけるラットの体重 (左上段) 及び 1 週毎の体重増加曲線

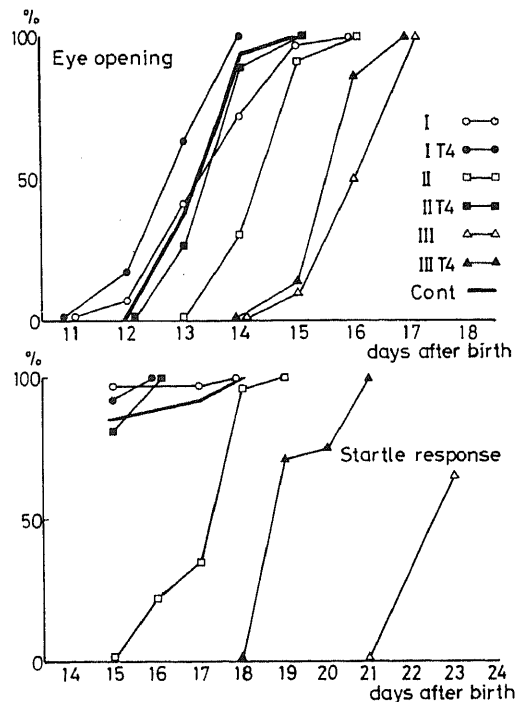


図 2 開眼時期 (上段) と驚愕反射の出現時期 (下段)

17 日目と改善を示さなかった。

驚愕反射 (図 2): 実線で示したコントロール群と I 群, II 群では著明な差は認められなかったが, III 群では驚愕反射の出現率は 23 日目でも 60 ~ 70 % であり, 遅延を認めた。T₄ 補充による効果は各群で認められたが, III T₄ 群ではその改善度が悪かった。

低温環境への適応 (図 3): 生後 2 週に, 20 °C の室温に放置後の体温はコントロール群で 35.8 ± 0.2 °C であったが, III 群では 35 °C 以下となり, 悪寒, 戦慄様の不随意運動を示した。T₄ 補充群では, III T₄ 群に有意の低体温が認められたが, I T₄ 群では有意の体温上昇を認めた。生後 4 週における 4 °C の低温室への放置では, III 群にのみコントロール群に比し有意の低体温が認められた。

大脳及び小脳の重量 (表 1), DNA, RNA, ³H-thymidine の DNA への取り込み (図 4, 5, 6): 大脳の重量はコントロール群に対し, 生後 3 週で III T₄ 群のみ有意に低値であったが, 生後 5 週では I T₄ 群, II 群, III 群, III T₄ 群で有意な低値を示した。大脳における単位湿重量当りの DNA 含量, RNA 含量及び

RNA/DNA 比は生後 3 週, 5 週においてコントロール群と PTU 処置群との間ではほとんど差が認められなかったが, ³H-thymidine の DNA への取り込みは II 群で $5.49 \pm 0.43 \times 10^2$ dpm/μg DNA-P, III 群で $12.05 \pm 3.34 \times 10^2$ dpm/μg DNA-P とコントロール群 ($4.17 \pm 0.71 \times 10^2$ dpm/μg DNA-P) に比し有意な高値を示した。T₄ 補充群では, III T₄ 群が $8.44 \pm 2.04 \times 10^2$ dpm/μg DNA-P と有意な高値を示した。

小脳の重量は大脳と異なり, 生後 3 週, 5 週共にコントロール群と PTU 処置群との間ではほとんど差がなかった。しかしながら, 生後 3 週から 5 週にかけての重量の変化では, PTU 処置群 (I 群, I T₄ 群, II 群) で小脳の重量が減少していた。小脳における単位湿重量当りの DNA 含量は生後 3 週で, I T₄ 群と III 群でコントロール群に比し有意な低下を認めたのみであったが, 生後 5 週ではコントロール群が 11.97 ± 1.93 μg DNA-P/g tissue であるのに対し, PTU 処置群では T₄ 補充の有無に関わらず, 14.0 μg DNA-P/g tissue 以上の有意な高値を示した。小脳の RNA 含量にはコントロール群と PTU 処置群との間で有意差は

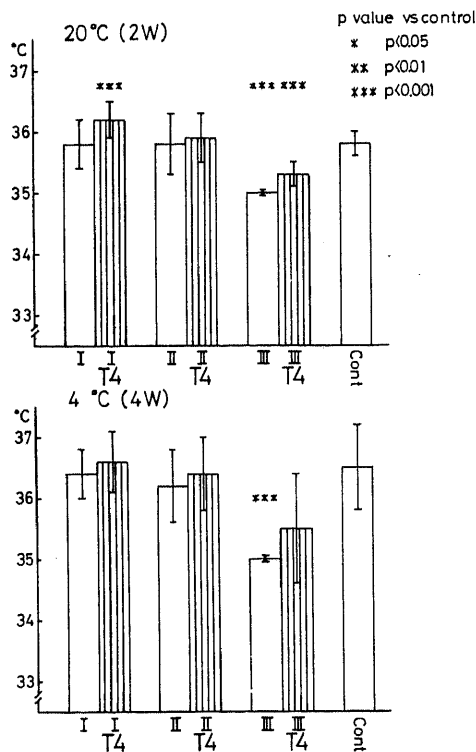


図 3 生後 2 週 (上段) と 4 週 (下段) における低温環境への暴露時のラットの体温

表 1 生後 3 週及び 5 週における大脳と小脳の重量

Cerebrum	3 w (g)	5 w (g)
I	1.09±0.07	1.14±0.03
I T ₄	0.98±0.03	1.04±0.03***
II	0.96±0.04	1.01±0.07*
II T ₄	0.93±0.11	1.00±0.10
III	0.90±0.07	1.06±0.03**
III T ₄	0.88±0.05*	0.97±0.05***
control	1.04±0.05	1.20±0.03
Cerebellum	3 w (g)	5 w (g)
I	0.27±0.03*	0.20±0.01
I T ₄	0.23±0.03	0.19±0.01
II	0.21±0.04	0.22±0.02
II T ₄	0.19±0.04	0.22±0.03
III	0.24±0.03	0.23±0.03
III T ₄	0.20±0.01	0.21±0.01
control	0.19±0.02	0.22±0.03

数値は平均値±S.D. で表わした。

P value は Student's t-test によった。

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

認められなかった。小脳での RNA/DNA 比は生後 3 週で、コントロール群が 0.32 ± 0.02 であり、これに対し I 群, II 群, III 群, III T4 群では 0.35 以上であり、有意に PTU 処置群で大きかった。生後 5 週ではコントロール群の RNA/DNA 比が 0.67 ± 0.03 であるのに対し、PTU 処置群では T4 補充の有無に関わらず 0.50 以下の有意な低下を示した。小脳での ^3H -thymidine の DNA への取り込みは I 群, II 群, II T4 群, III 群, III T4 群でコントロール群の $1.54 \pm 0.40 \times 10^2$ dpm/ μg DNA-P に対し有意に増加し、特に III 群, III T4 群の長期 PTU 処置群において著しい取り込みの増加を認めた。T4 補充により取り込みの低下傾向を認めたが、その差は大きくなかった。

生後 5 週での ^3H -thymidine の DNA への取り込みは非常に少なく、検討不可能であった。

考 察

ラットにおける神経細胞の成熟過程において、生後大脳で 50% 、小脳で 97% の神経細胞が獲得されると

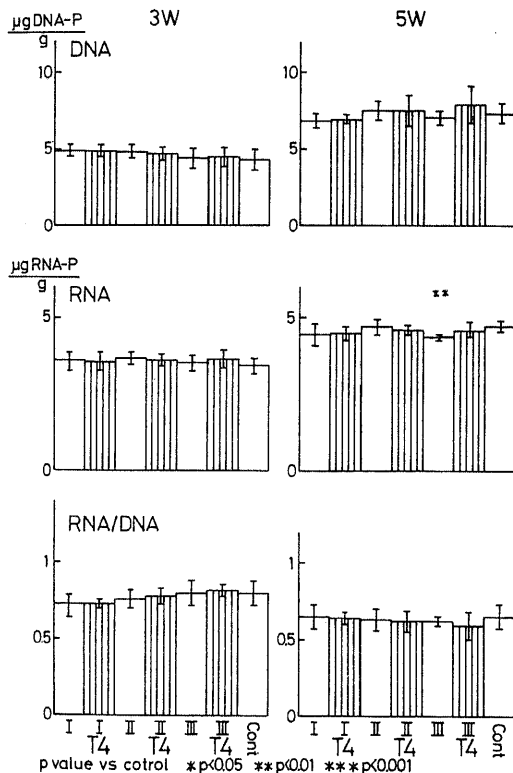


図 4 生後 3 週と 5 週の大脳における DNA 含量, RNA 含量と RNA/DNA 比

言われている²⁶⁾。大脳では大部分の神経細胞は出生前に形成されており²⁷⁾、甲状腺機能低下状態にはほとんど影響されない¹²⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾。一方、小脳では特定の細胞を除

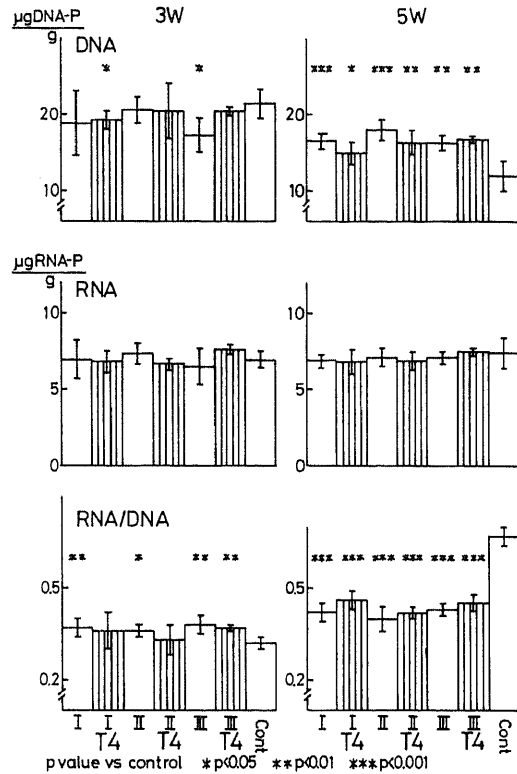


図 5 生後 3 週と 5 週の小脳における DNA 含量, RNA 含量と RNA/DNA 比

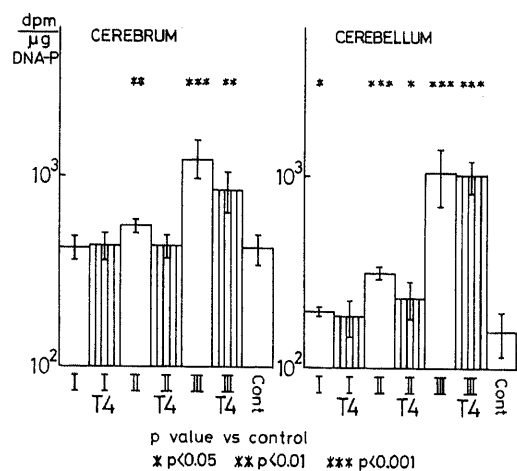


図 6 生後 3 週における大脳と小脳の ^3H -thymidine の DNA への取り込み

き、ほとんどの神経細胞が出生後に形成される²⁷⁾。小脳の出生後の細胞形成過程は形態学的変化と生化学的变化とがよく一致し²⁸⁾。正常ラットでは生後5日から14日目までの期間、小脳外側顆粒層の細胞増殖を反映して小脳DNA含量は増加する²⁸⁾。第3週に入ると、外側顆粒層は退縮し、生後21日目頃には消失する。そしてその結果、小脳DNA含量も成熟ラットのレベルに達する²⁶⁾²⁸⁾。このように出生後短期間に著しい変化をとげる小脳は甲状腺ホルモン作用の中枢神経発達に対する影響をみる上で、適当な領域であると言える。甲状腺機能低下状態では小脳の細胞獲得の過程は正常ラットより遅延し、生後2週すぎより細胞数が急速に増加する(catch-up cell acquisition)。そして最終的には正常ラットと同様の細胞数を獲得する¹¹⁾¹²⁾²⁶⁾³⁰⁾。この過程はLegrandらにより形態学的にも確認されており³¹⁾⁴³⁾³⁰⁾、生後2週以後消退していくはずの外側顆粒層が異常に長期間存在するためである。今回の成績では、PTU処置群の生後3週でのRNA/DNA比(cell sizeを示す²⁶⁾)は高値であり、PTU処置群の小脳ではこの時期に胞体の大きい細胞が存在していると考えられた。又、PTU処置群の生後3週の小脳重量は重い傾向にあり、それが生後5週になると重量の減少する群がみられた。これはHolt¹⁸⁾が述べているように、細胞に占める水分含量が大きいことを示していると考えられる。生後5週でのPTU処置群は細胞数の指標となるDNA含量²⁷⁾が増加し、RNA/DNA比は小さくなっていた。これはこの時期に、PTU処置群の小脳に胞体の小さい細胞が密に存在することを示し、細胞獲得が活発化してきていることを示している。以上の小脳の細胞獲得過程の遅延はT₄補充にも関わらず、PTU処置群に共通して認められ、在胎期から出生後早期までの甲状腺機能低下状態が小脳神経細胞の増殖過程に障害を及ぼし、甲状腺ホルモン作用のcritical periodが胎生期にまで及んでいることが推測された。

一方、PTUの飲用により生ずる母ラットの甲状腺機能低下症あるいは水分摂取量の低下により、仔ラットに十分な栄養が与えられない可能性が懸念され、仔ラットにおけるmalnutritionが本実験の結果に関与している可能性がある。しかしながらmalnutrition時には中枢神経系の変化は神経細胞の恒久的な減少を示し^{32)~35)}、生化学的には脳DNA含量が低下し^{36)~38)}、RNA/DNA比は正常値を示す³⁹⁾とされている。このことより小脳における実験結果は甲状腺機能低下状態によって引き起こされたものといえる。

代謝面から見ると、大脳、小脳共にPTU処置群(特

に長期処置群)にthymidineのDNAへの取り込みが強くみられた。正常ラットの脳におけるDNAへのthymidineの取り込みは生後6日目に急増し、その後15日目までに急速に低下する³⁹⁾。PTU処置群での脳DNAへのthymidineの取り込みの亢進は生化学的变化の裏付けであり、甲状腺機能低下状態が大脳にも代謝的な影響を与えていることを示している。この現象はおそらく全身的にも起こっていると想像され、PTU処置群に認められた体重増加不良、発育速度の時間的な遅延もこれで説明されると考えられた。

神経構築の成熟、特に嗅脳、海馬、小脳のinterneuronsの形成が甲状腺ホルモン作用に密接に関係しており、甲状腺機能低下状態ではこの成熟過程も障害される¹²⁾。驚愕反射は外的刺激に対する基本的な適応行動の一つであり、この出現に不可欠な要素は大脳皮質あるいは視床下部におけるシナプス形成の成熟である⁹⁾。本実験で胎生期から生後2週までPTU投与を行なったラットでは著しい驚愕反射の出現遅延が認められ、T₄補充によっても改善傾向があまりみられなかった。開眼は大脳皮質のシナプス形成に関係しており⁹⁾、本実験でも驚愕反射の出現と非常に似通った結果を示した。このことは神経構築の完成が甲状腺機能低下状態により抑制を受け、そのcritical periodが生後1~2週の間に存在することが示唆される。神経構築の生化学的指標となるacetylcholinesterase⁸⁾⁹⁾⁴⁰⁾、succinic dehydrogenase⁹⁾の活性は生後10日すぎより脳内含量が増加し⁶⁾、その時期に一致して脳波の出現がラットにおいて認められる⁹⁾。このようなプロセスと驚愕反射や開眼は密接に関係していることが想像される。甲状腺機能亢進状態を出生後から作製すると、ラットに驚愕反射の出現時期、開眼時期の促進がみられるが、このようなラットでは加齢に伴ない学習行動等に劣悪な反応が認められるという⁹⁾。これはシナプス形成過程が甲状腺ホルモンの過剰により協調を欠いて成熟するためであると説明されている⁹⁾。以上の如く、出生後早期の甲状腺ホルモンの過不足はラットの神経構築の成熟に重要な役割を演じている。

甲状腺ホルモンは下垂体-甲状腺系のみならず、他の視床下部-下垂体-末梢ホルモン系とも関連している⁴¹⁾。体温調節は仔ラットの母ラットからの独立という意味で重要であるが⁷⁾、この機構は甲状腺ホルモンによる調節よりもむしろ下垂体-副腎系による調節が主体であると考えられている⁴²⁾。しかし甲状腺ホルモンによるカロリー産生も関与しており⁶⁾⁴¹⁾、下垂体-副腎系との協同作用により体温を安定化すると考えられ

る。体温調節に関する実験結果は胎生期から生後2週までPTUを投与されたラットにのみ障害が認められ、この機構が直接的に甲状腺ホルモンによって調節されないとしても、その完成としての critical period が生後1~2週の間に存在することが推測される。

発育(体重増加)も種々のホルモンの総和により発現するが、出生後¹³⁾IあるいはPTU投与により甲状腺機能低下状態を作製したラットでは、生後6日目の体重はコントロールとは差がなく、生後21日目より急速に低体重を示してくると述べられている⁴⁹⁾。胎生期からPTUを投与した今回の実験では、コントロール群に比しPTU処置群で生下時体重の少ない傾向が認められた。これは同腹の仔ラットの数にもよるが、子宮内での発育不全の可能性も否定できない。後者であれば甲状腺機能低下状態が直接的に胎子の発育に影響していることになる。一般に、クレチン症患児の出生時体重は large for dates であり⁴⁴⁾、対照的な実験結果であったが、ラットとヒトとを同一レベルで比較検討することは困難であろう。本実験では、PTU処置群の体重増加は生後2~3週頃より低下傾向を示し、生後5週ではT4補充にも関わらずPTU処置群全てに低体重を認めた。又、急速な体重増加を示す(growth spurt)時期も遅延し、成長ホルモン、性腺ホルモンの二次的な機能障害が考えられた。この発育過程は、malnutritionが脳DNA含量、RNA/DNA比より否定されており、甲状腺機能低下状態に起因したものであると考えられ、発育に関する甲状腺ホルモン作用の critical period が胎生期に存在することが示唆された。出生直後より甲状腺摘除を行なったラットでは、下垂体成長ホルモン含量は著しく低下し、体重増加が甲状腺ホルモンの投与なしでは認められなかったと報告されている⁴⁵⁾。ヒトでも甲状腺機能低下症例で、成長ホルモン分泌の抑制があり、甲状腺ホルモンの補充により成長ホルモン分泌能が改善する例がある。これらの事実は発育に関して甲状腺ホルモンが直接的に、あるいは成長ホルモン合成過程の促進を介して影響を及ぼしていると考えられる。

以上、ラットにおける中枢神経発達に対する甲状腺ホルモン作用の影響(特に胎生期から出生後早期における甲状腺機能低下状態の及ぼす影響)を神経細胞レベルでの成熟、神経構築の成熟、更に視床下部-下垂体-末梢ホルモンとの関連について検討、考察した。最も問題となるのは仔ラットに甲状腺機能低下状態が存在したかどうかであるが、仔ラットに実験的甲状腺機能低下症を作製するためのPTU投与の有効性は認

められており¹⁶⁾、著者も予備実験により、これを確認した。それによると、PTU投与中は仔ラットは常に甲状腺機能低下状態にあり、PTU投与中止後1~2週で血中T4濃度は正常化した。本実験でのPTU投与中止後のT4補充投与の意味は速かに甲状腺ホルモンの血中レベルを正常化させるためであったが、補充量としては多量であった可能性がある。

ラットにおける甲状腺ホルモン作用の critical period は発育を含め細胞増殖過程では胎生期、比較的高次の神経構築の完成や視床下部-下垂体系との関連については生後1~2週であると考えられた。ラットの生後2週頃がヒトの出生時期に相当すると考えられ⁸⁾、このことからすれば、ヒトでも胎期における甲状腺ホルモン不足は出生後の知能発達、行動発達に重要な役割を演ずることが想像される。臨床的に早期診断され、適切な治療がなされたと考えられるクレチン症患児においても、知能発達や運動発達が必ずしも調和のとれたものでないことに遭遇する。このようなことも胎生期における甲状腺ホルモン不足が中枢神経系の発達不全を来したと考えられよう。今後、神経学的に後遺症のない発達を与えるようなクレチン症の治療法の確立が望まれる。

結 論

0.05% PTU溶液を母ラットに妊娠第14日目より投与し、仔ラットに甲状腺機能低下状態を作製した。PTU投与期間により仔ラットをⅠ~Ⅲ群に分け、更にPTU処置群の同腹の半数にPTU投与中止後、T4 2 μ gを隔日3回皮下投与し、各々ⅠT4~ⅢT4群とした。無処置の母ラットから生まれた仔ラットをコントロール群とし、体重増加、開眼時期、驚愕反射の出現時期、低温環境への適応、大脳及び小脳の重量、DNA、RNA含量、thymidineのDNAへの取り込みを比較、検討した。

1. 大脳及び小脳のDNA、RNA/DNA比、thymidineのDNAへの取り込みで検討した細胞レベルでの甲状腺機能低下状態の影響は大脳にはほとんどなく、小脳において認められた。小脳ではPTU処置群全てに細胞獲得過程の遅延が認められ、T4補充によっても改善されず、神経細胞増殖過程における甲状腺ホルモン作用の critical period は胎生期に存在すると考えられた。

2. 神経構築の成熟は開眼と驚愕反射の出現を指標として観察したが、PTUを生後2週まで投与されたⅢ群に遅延が認められ、T4補充(ⅢT4群)によっても改善傾向がなかった。神経構築に関する甲状腺ホル

モン作用の critical period が生後 1～2 週に存在することが推定された。

3. 視床下部-下垂体-末梢ホルモンの関連について、体温調節（下垂体-副腎系）と体重増加（成長ホルモン、下垂体-性腺系）を指標として検討した。体温調節は PTU を生後 2 週まで投与されたⅢ群に障害が認められ、critical period は生後 1～2 週と考えられた。体重増加に関しては、PTU 処置群全てに体重増加不良、体重の急速な増加時期の遅延が認められ、critical period は胎生期にあると考えられた。

4. 以上を総合し、甲状腺機能低下状態において観察した甲状腺ホルモン作用の critical period は胎生期から生後 2 週の間にあることが示唆された。ヒトの出生時期がラットの生後 2 週頃とほぼ一致すると言われ、ヒトでの甲状腺ホルモン欠損の中枢神経系に対する影響が胎生期から存在する可能性が想像された。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜った恩師谷口昂教授に深甚の謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、終始直接御指導、御教示を賜った佐藤保助教授に深く感謝します。併せて、多大な御協力を頂いた小児科内分泌グループの諸先生、教室諸兄に感謝します。

なお、本論文の要旨は、第 51 回日本内分泌学会総会（1978）において発表した。

文 献

- 1) Dörner, G. & Staudt, J. : Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus on the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocr.*, **4**, 278-281 (1969).
- 2) Furguson-Smith, M. A. : Testes and intersexuality, p359-393. In D. Hubble (ed.), *Paediatric Endocrinology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1969.
- 3) Legrand, P. J. : Maturation du cervelet déficience thyroïdienne : données chronologiques. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, **52**, 205-214 (1963).
- 4) Hamburgh, M. : An analysis of the action of thyroid hormone on development based on in vivo and in vitro studies. *Gen. Comp. Endocr.*, **10**, 198-213 (1968).
- 5) Lewis, P. D., Patel, A. J., Johnson, A. L. & Balázs, R. : Effect of thyroid deficiency on cell acquisition in the postnatal rat brain : A quantitative histological study. *Brain Res.*, **104**, 49-62 (1976).
- 6) Schapiro, S. : Some physiological, biochemical, and behavioral consequences on neonatal hormone administration : Cortisol and thyroxine. *Gen. Comp. Endocr.*, **10**, 214-228 (1968).
- 7) Samel, M. : Thyroid function during postnatal development in the rat. *Gen. Comp. Endocr.*, **10**, 229-234 (1968).
- 8) Hamburgh, M. & Flexner, L. B. : Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis-XXI. Effect of hypothyroidism and hormone therapy of enzyme activities of the developing cerebral cortex of the rat. *J. Neurochem.*, **1**, 279-288 (1957).
- 9) Geel, S. E. & Timiras, P. S. : Influence of neonatal hypothyroidism and of thyroxine on the acetylcholinesterase and cholinesterase activities in the developing central nervous system of the rat. *Endocrinology*, **80**, 1069-1074 (1967).
- 10) Balázs, R., Kovács, S., Teichgräber, P., Cocks, W. A. & Eayrs, J. T. : Biochemical effects of thyroid deficiency on the developing brain. *J. Neurochem.*, **15**, 1335-1349 (1968).
- 11) Patel, A. J. & Balázs, R. : Effect of thyroid hormone on metabolic compartmentation in the developing rat brain. *Biochem. J.*, **121**, 469-481 (1971).
- 12) Balázs, R., Patel, A. J. & Hajós, F. : Factors affecting the biochemical maturation of the brain : Effects of hormones during early life. *Psychoneuroendocr.*, **1**, 25-36 (1975).
- 13) Hughes, A. M. : Cretinism in rats induced by thiouracil. *Endocrinology*, **34**, 69-76 (1944).
- 14) Myant, N. B. : On the possible rôle of the thyroid in the control of the development of the mammalian brain. *Biol. Neonat.*, **9**, 148-165 (1965/1966).
- 15) Robinson, N. & Eayrs, J. T. : Histochemical study of the cerebral cortex in rats thyroidectomised at birth. *Brain Res.*, **9**, 351-362 (1968).
- 16) Bakke, J. L., Gellert, R. J. & Lawrence, N. L. : The persistent effects of perinatal

hypothyroidism on pituitary, thyroidal, and gonadal functions. *J. Lab. Clin. Med.*, **76**, 25 - 33 (1970).

17) **Nicholson, J. L. & Altman, J.** : The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res.*, **44**, 13 - 23 (1972).

18) **Holt, A. B., Kerr, G. R. & Cheek, D. B.** : Prenatal hypothyroidism and brain composition. p141 - 153. In D. B. Cheek (ed.), *Fetal and postnatal cellular growth*, A Wiley Biochemical-Health Publications, John Wiley & Sons, New York, 1975.

19) **Larsen, P. R. & Broskin, K.** : Thyroxine (T4) immunoassay using filter paper blood samples for screening of neonates for hypothyroidism. *Pediat. Res.*, **9**, 604 - 609 (1975).

20) **LaFranch, S. H., Buist, N. R. M., Murphy, W. H., Larsen, P. R. & Foley, T. P.** : Transient neonatal hypothyroidism detected by newborn screening program. *Pediatrics*, **60**, 538 - 541 (1977).

21) **Smith, D. W., Blizzard, R. M. & Wilkins, L.** : The mental prognosis in hypothyroidism of infancy and childhood. A review of 128 cases. *Pediatrics*, **19**, 1011 - 1022 (1957).

22) **Hutchinson, J. H.** : Diseases of the thyroid gland. p113 - 154. In D. Hubble (ed.), *Paediatric Endocrinology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1972.

23) **Nataf, B. M.** : Fetal rat thyroid gland in organ culture. *Gen. Comp. Endocr.*, **10**, 159 - 173 (1968).

24) **Schmidt, G. & Thanheuser, S. J.** : A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83 - 89 (1945).

25) **Fiske, C. H. & Subbarow, Y.** : The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 - 400 (1925).

26) **Balázs, R., Kovács, S., Cocks, W. A., Johnson, A. L. & Eayrs, J. T.** : Effect of thyroid hormone on the biochemical maturation of rat brain : Postnatal cell formation. *Brain Res.*, **25**, 555 -

570 (1971).

27) **Altman, J.** : DNA metabolism and cell proliferation. p137 - 182. In A. Lajtha (ed.), *Handbook of Neurochemistry*, Vol 2. Plenum Press, New York, 1969.

28) **Mandel, P., Rein, H., Harth-Edel, S. & Mardell, R.** : Distribution and metabolism of RNA in the vertebrate nervous system. p149 - 163. In D. Richter (ed.), *Comparative Neurochemistry*, Pergamon, London, 1964.

29) **Balázs, R., Brooksbank, B.W.L., Davidson, A. N., Eayrs, J. T. & Wilson, D. A.** : The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Res.*, **15**, 219 - 232 (1969).

30) **Patel, A. J., Rabié, A., Lewis, P. D. & Balázs, R.** : Effect of thyroid deficiency on postnatal cell formation in the rat brain : A biochemical investigation. *Brain Res.*, **104**, 33 - 48 (1976).

31) **Légrand, P. J.** : Analyse de l'action morphogénétique des thyroïdiennes sur le cervelet de jeune rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, **56**, 205 - 244 (1967).

32) **Fish, I. & Winick, M.** : Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. *Exp. Neurol.*, **25**, 535 - 540 (1969).

33) **Chase, H. P., Lindsley, W. F. B. Jr. & O'Brien, D.** : Undernutrition and cerebellar development. *Nature, Lond.*, **221**, 554 - 555 (1969).

34) **Winick, M.** : Malnutrition and brain development. *J. Pediat.*, **74**, 667 - 679 (1969).

35) **Gourdon, J., Clos, J., Coste, C., Dainat, J. & Légrand, J.** : Comparative effects of hypothyroidism, hyperthyroidism and undernutrition on the protein and nucleic acid contents of the cerebellum in young rat. *J. Neurochem.*, **21**, 861 - 871 (1973).

36) **Winick, M. & Noble, A.** : Quantitative changes in DNA, RNA, and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Devel. Biol.*, **12**, 451 - 466 (1965).

37) **Dickerson, J. W. T., Dobbing, J. & McCance R. A.** : The effect of undernutrition on the postnatal development of the brain and cord in pigs. *Proc. R. Soc. Ser. B*, **166**, 396 - 407 (1967).

38) **Altman, J.** : Autoradiographic and

histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neur.*, **128**, 431-474 (1966).

39) **Mori, K., Yamagami, S. & Kawakita, Y.** : Thymidine metabolism and deoxyribonucleic acid synthesis in the developing rat brain. *J. Neurochem.*, **17**, 835-843 (1970).

40) **Ling, A. S. C.** : The influence of the thyroid gland on brain cholinesterase activity of mature rats. *Brain Res.*, **22**, 73-80 (1970).

41) **Talanti, S.** : The effect of thyroidectomy on the hypothalamus of the rat with special reference to the hypothalamic-hypophyseal neurosecretory system. *Acta Physiol. Scand.*, **70**, 80-87 (1967).

42) **Taylor, A. N. & Lengvári, I.** : Effect of combined perinatal thyroxine and corticosterone treatment on the development of the diurnal pituitary-adrenal rhythm. *Neuroendocr.*, **24**, 74-79 (1977).

43) **Schapiro, S.** : Metabolic and maturational effects of thyroxine on the infant rat. *Endocrinology*, **78**, 527-532 (1966).

44) **Anderson, H. J.** : Nongoitrous hypothyroidism. p216-234. In L. I. Gardner (ed.), *Endocrine and Genetic Diseases of Childhood*, W. B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1969.

45) **Harvas, F., Morreale de Escobar, G. & Escobar Del Rey, F.** : Rapid effects of single small doses of l-thyroxine and triiodo-l-thyronine on growth hormone, as studied in the rat by radioimmunoassay. *Endocrinology*, **97**, 91-101 (1975).

The Critical Period of Thyroid Hormone Actions to the Development of Central Nervous System in Rats Yukichi Suzuki, Department of Pediatrics (Director Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Jusen Med. Soc.*, 89, 620—629 (1980).

Abstract The critical period of thyroid hormone actions in the developing rat brain was studied in propylthiouracil (PTU) treated rats during fetal, 1 and 2 weeks of postnatal period. After cessation of PTU, half of litter mates received thyroxine (T₄) replacement. Significant retardation was noted in body weight gain, the time of eye opening and of acquisition of startle response, the latter two of which could not be recovered with T₄ replacement in hypothyroid rats during 2nd week after birth. Moreover, adaptation of body temperature to cold was also impaired in this group. Cerebral DNA, RNA and RNA/DNA ratio (cell size) at the 5th week of age were not affected by PTU treatment, while cerebellar DNA at the 5th week significantly increased and RNA/DNA at the 5th week was markedly reduced in all PTU treated rats. An concomitant increase in ³H-thymidine incorporation to cerebral and cerebellar DNA was also observed in all PTU treated rats, which indicated delay in cell proliferation phase in their brains.

These results suggest that most of the impaired brain functions in developing rat induced by T₄ deficiency by the first week of life are recovered, but not after 2 weeks even if replaced with T₄. However, several impairments, such as delay in growth spurt and in stage of cerebellar cell proliferation seems to remain persistently. Therefore, the critical period of thyroid hormone actions in the rat brain appears to be during prenatal period and 2 weeks after birth.